

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. F. Ulbrich

Ist der von Lehnert entwickelte Test für die Diagnose der Rinderleukose geeignet?

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Wolfgang Buss
Tierarzt aus Frankfurt/Oder

Gießen 1966

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. F. Ulbrich

Ist der von Lehnert entwickelte Test für die Diagnose der Rinderleukose geeignet?

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Wolfgang Buss
Tierarzt aus Frankfurt/Oder

Gießen 1966

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Giessen

Dekan: Professor Dr. H. Bartels

Berichterstatter: Professor Dr. F. Ulbrich

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 1966

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Problemstellung	1
B. Schrifttum über Möglichkeiten der Leukose- diagnose beim Rind	2
1. Klinische Erscheinungen	2
2. Blutveränderungen	2
3. Pathologisch-anatomisches und histologisches Bild einschließlich elektronenmikroskopischer Befunde	3
4. Hinweise auf virusbedingte Reaktionen in Ge- webekulturen	6
a) Gestaltsveränderungen und Wachstumsver- änderungen von Zellen	6
b) Chromosomenanomalien	9
c) Weitere Eigenschaftsänderungen weißer Blutzellen von leukosekranken Rindern	10
5. Serologische Reaktionen	10
a) Elektrophorese	10
b) Abderhaldensche Abwehrreaktion	11
c) Komplementbindungsreaktion, Präzipitation	12
d) Fluoreszenzserologie	12
e) Serumreaktion nach Lehnert	13
C. Eigene Versuche	14
1. Untersuchungen von Blutserumproben aus leu- kosefreien und leukosebefallenen Rinderbe- ständen	14
a) Material	14
b) Methode	15
c) Ergebnisse	18
2. Versuche, das für die Serumreaktion nach Lehnert benötigte "Antigen" zu reinigen	20
a) Material und Methode	20
b) Ergebnisse	22

D.	Besprechung der Ergebnisse	23
E.	Zusammenfassung	28
F.	Literaturverzeichnis	29

A. Problemstellung

Nach dem zweiten Weltkriege breitete sich in Deutschland die Rinderleukose von Ost nach West aus und wurde zu einem erstrangigen Problem der Tierseuchenbekämpfung insbesondere dadurch, daß die Frühdiagnose der Krankheit große Schwierigkeiten bereitet. Keines der bisher angewendeten diagnostischen Verfahren konnte befriedigen. Im Jahre 1963 empfahl LEHNERT (28) eine serodiagnostische Methode zum Nachweis leukosespezifischer Antikörper im Blutserum leukosekranker Rinder.

Meine Aufgabe war, zu klären, ob der von Lehnert entwickelte Test für die Diagnose der Rinderleukose geeignet ist und ob eine grössere Spezifität durch Reinigung des Antigens erreicht werden kann.

B. Schrifttum über Möglichkeiten der Leukosediagnose beim Rind

Nach den bisherigen Untersuchungen (FORTNER, 12; GÖTZE et al., 15; ULBRICH, 50) darf angenommen werden, daß es sich bei der Rinderleukose um eine virusbedingte Krankheit handelt, bei der genetische Faktoren eine Rolle spielen.

1. Die ersten klinischen Erscheinungen sind in der Regel Schwellungen der äußerlich sichtbaren oder fühlbaren Lymphknoten; diese sind dabei gut abgegrenzt, leicht verschiebbar und offenbar schmerzlos. Bei Bildung retrobulärer Geschwülste kommt es zum Exophthalmus. Bei fehlendem Fieber und fortschreitender Abmagerung tritt der Tod unter dem Bilde der Kachexie ein. Nicht selten sind unerwartete Todesfälle, wenn lebenswichtige innere Organe, wie Herz und Milz, besonders befallen sind und plötzlich versagen (Milzruptur); dabei können äußerlich sichtbare Veränderungen noch fehlen (FORTNER, 12).

Die tumorösen Veränderungen sind die Grundlage für die klinische Diagnose der Rinderleukose; aber nur etwa 5 - 10 % der Leukoserinder entwickeln Tumoren (BENDIXEN, 5; RITTER, 37; ROSENBERGER, 38; TOLLE et al., 48). Für die Bekämpfung der Rinderleukose ist es daher von grosser Bedeutung, daß die "subklinisch" kranken Tiere erkannt werden.

2. Zur Diagnose "subklinisch" leukosekranker Rinder hat bisher nur die Feststellung von Blutveränderungen praktischen Wert erreicht.

Grundlegende Untersuchungen über die Morphologie des normalen und des leukämischen Rinderblutes wurden vor 50 Jahren von DU TOIT (43, 44) ausgeführt. Darauf aufbauend empfahlen im Jahre 1954 GÖTZE, ROSENBERGER und ZIEGENHAGEN (14) die hämatologische Untersuchung für die Routinediagnostik der Rinderleukose. Nach ihrem sog. "Leukoseschlüssel" spricht eine

anhaltende Erhöhung der Lymphozytenwerte im Blut der Rinder für Leukose. Der "Leukoseschlüssel" von GÖTZE und Mitarb. wurde mehrfach modifiziert (BENDIXEN, 6; WINQUIST, 61; TOLLE, 46). Ausführung und Beurteilung der Blutuntersuchung zur Diagnose der Rinderleukose sind heute durch eine Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten vom 8. 2. 1965 einheitlich vorgeschrieben (8).

Bei dem in der Richtlinie angegebenen Blutuntersuchungsverfahren handelt es sich um eine quantitative Beurteilung der weißen Blutkörperchen des peripheren Blutes. Es hat auch nicht an Versuchen gefehlt, mit Hilfe qualitativer Blutuntersuchungsmethoden die Aussagekraft bei der Leukosediagnostik zu verstärken. ZIEGENHAGEN und DÖHMEN (63) setzten sich mit dem Wert der morphologischen Beurteilung der Leukozyten für die Diagnostik der Rinderleukose kritisch auseinander. Sie kamen unter Auswertung der Literatur zu dem Schluß, dass weder Lymphoidozyten, Spindelzellen, Riederzellen noch Paralymphoblasten als spezifische Tumor- oder Leukosezellen angesehen werden können und qualitative Befunde an den lymphozytären Elementen des Blutes den "Leukoseschlüssel" manchmal ergänzen, aber nicht ersetzen können.

In neuerer Zeit fanden histo- und cytochemische Untersuchungen besondere Beachtung. Übereinstimmend fanden BAUER-SIC (4) und STÖBER (42) beim Vergleich von Lymphocyten gesunder Rinder und von Lymphozyten von Leukoserindern in letzteren einen erhöhten Gehalt an Glykogen, RNS, saurer Phosphatase und Milchsäuredehydrogenase. Die bisher beobachteten Unterschiede sind aber offenbar ebenfalls nur quantitativer Art. Zu diesen Ergebnissen kamen auch NOBEL und NEUMANN (33).

3. Vom wissenschaftlichen Standpunkt ist für die Leukosediagnostik bis jetzt allein das pathologisch-anatomische und histologische Bild entscheidend. Der Zerlegungsbefund ist

außerordentlich charakteristisch mit den enormen diffusen Schwellungen der Lymphknoten und der Leber oder den umschriebenen geschwulstartigen, grauweißen Knoten in allen anderen Organen wie Milz, Nieren, Herz- und Skelettmuskulatur, Uterus, Euter, Magen und Darm, serösen Häuten und Lunge. Die Knoten, einzeln bis mannskopfgroß, fließen manchmal zu Konglomeraten zusammen, besonders auf den serösen Häuten. In der Beckenhöhle stellen sie Geburtshindernisse dar. Die grösseren Knoten sind im Innern zuweilen nekrotisch und dann von auffallend gelber Farbe.

Histologisch bestehen die Geschwülste aus jugendlichen Lymphknoten, die infiltrierend in das benachbarte Gewebe vordringen.

Während die pathologische Anatomie und Histologie der lymphadenotischen "tumorösen" Form der Leukose des Rindes seit den Untersuchungen von DOBBERSTEIN und PAARMANN (9) hinreichend bekannt sind, sind die Beziehungen der hämatologischen Befunde zu den morphologisch feststellbaren Veränderungen weniger bekannt. Dieses gilt besonders für die Fälle, bei denen auf Grund einer Vermehrung der Lymphocyten im Blut eine "subklinische" Form der Leukose diagnostiziert wird, aber weder klinisch noch pathologisch-anatomisch typische leukotische Veränderungen nachzuweisen sind. RENK (36) kam nach umfangreichen pathologisch-anatomischen und histologischen Untersuchungen an Rindern mit anhaltenden lymphocytotischen Blutbefunden und an Rindern mit Leukose zu dem Schluß, daß die Lymphocytose kein spezifisches Merkmal für die Lymphadenose ist und daß auf Grund des hämatologischen Befundes eines Einzeltieres oder einer einmaligen Untersuchung des Bestandes eine Diagnose über das Vorhandensein der Leukose nicht gestellt werden kann. Andererseits ist es eine Erfahrungstatsache, daß Rinder, die in Leukosebeständen stehen und spontan an einer Lymphadenose erkranken, zuvor meistens eine anhaltende Lymphocytose

aufwiesen. Da in solchen Beständen häufig noch weitere Tiere mit erhöhten Lymphocytenwerten beobachtet werden, kann daraus abgeleitet werden, daß diese Tiere mit grosser Wahrscheinlichkeit ebenfalls leukosekrank sind.

Wenn sich auch die mehrmalige Blutuntersuchung bei Berücksichtigung der klinischen und gegebenenfalls der pathologisch-anatomischen und histologischen Bestandsuntersuchung als Herdentest nach den bisherigen Erfahrungen bewährt hat, so muß kritisch hervorgehoben werden, daß dem Verfahren Mängel anhaften (normale Blutwerte in der Inkubationszeit, aleukämische Verlaufsform, Normalisierung des Blutbefundes bei Leukose und nicht durch Leukose bedingte Lymphocytomatosen).

Bei der Suche nach weiteren Diagnosemöglichkeiten lag es nahe, den vermuteten Erreger der Rinderleukose elektronenmikroskopisch und in Gewebekulturen nachzuweisen.

Submikroskopische Darstellungen virusähnlicher Partikel in den Lymphadenosezellen von Rindern veröffentlichten UEBERSCHÄR (49), SORENSEN und THEILEN (41) sowie DUTCHER et al. (10). Bisher konnten die Befunde aber noch nicht mit Sicherheit gedeutet werden, und es ist noch offen, ob die beobachteten intracytoplasmatischen Partikel Virusteilchen sind, und ob sie mit der Leukosegenese in Zusammenhang stehen. Es sei auf die elektronenmikroskopischen Befunde an Lymphozyten und Lymphoidzellen des peripherischen Blutes leukosekranker und gesunder Rinder von KNOCKE (24) hingewiesen. KNOCKE fand nur bei den an Leukose erkrankten Rindern an den Kernen der lymphatischen Zellen Kernwandinvaginationen mit Zytoplasmaeinstülpungen in Kernnähe, die in Dünnschnitten als Einschlüsse erschienen. Die Kernwandinvaginationen hatten Ähnlichkeit mit den bei anderen Tumorzellen anderer Tierarten beobachteten Kernveränderungen. Weder in den Kernveränderungen noch an anderen Stellen der Lymphozyten oder Lymphoidzellen der an

tumoröser Leukose erkrankten Rinder wurden Partikel ange-
troffen, die auf Grund ihrer Form, Grösse und Anordnung als
Virus gedeutet werden konnten.

4. Hinweise auf virusbedingte Reaktionen in Gewebekulturen
sind ebenfalls noch spärlich.

a) Über Gestalts- und Wachstumsveränderungen weißer Blutzellen
leukosekranker Rinder in Leukozytenkulturen berichteten 1962
und 1963 ULBRICH und WIEGAND (53, 54). Kulturen weißer Blut-
zellen gesunder und leukosekranker Rinder unterschieden sich
dadurch, daß in Leukose-Leukozytenkulturen im Gegensatz zu
Normalkulturen vermehrt spindelförmige Zellen und Riesenzellen
vorkamen. Weiterhin wurde bei Kulturzellen leukosekranker Rin-
der stärkere Phagozytose von Lymphozyten und rosettenförmige
Anlagerungen von Lymphozyten an monozytoide Zellen der Kultur
von Leukose-Leukozyten beobachtet (WEINHOLD, 55).

Auch bei Virusanzüchtungsversuchen aus leukotischem Material
auf Zellkulturen wurden Gestalts- und Wachstumsveränderungen
an den Zellen beobachtet (s. Tabelle).

Autor	Methode und Zellart	beobachtete Reaktion
Bindrich, H. u. Ch. Gensel (1963)	Einschichtzellkultur Kälberhodengewebe embryon. Rindernieren	proliferative Verände- rungen der Zellen
Ulbrich, F. u. D. Wiegand (1963)	Einschichtzellkultur weiße Blutzellen aus 1. Leukoserindern 2. gesunden Rindern	4 Zelltypen werden in beiden Kulturen gefun- den. Spindelförmige Zellen kommen in den Kulturen von Leukose- tieren häufiger vor. Außerdem treten Riesen- zellen in großer Zahl auf, die Syncytien bil- den können. Keine Chro- mosomenanomalien.

Autor	Methode und Zellart	beobachtete Reaktion
Gard, S. u. G. Rockborn (1963)	Einschichtzellkultur Primär- und Subkultur (Eagle's Medium) Lymphknotengewebe, Knochenmark u. Blut- zellen v. Leukose- rindern. Lymphknotengewebe gesunder Rinder	Lymphocytenadsorption syncytiale Reaktionen In 7 - 10-tägigen Kul- turen bildet sich eine Fibrinoblastenschicht, in die polygonale Zellen eingestreut sind, die mehrschichtige Kolonien bilden und die Fibro- blasten überwuchern. Die- se Zellen ließen sich in Dauerkultur bringen.
Dutcher, R. M., I. E. Szekeley, B.W.Bartie u. J.W. Switzer (1964)	Einschichtzellkultur (in Eagle's Medium) Primär- u. Subkultur Lymphknotengewebe von Rindern mit 1. sporadischer Leu- kose (Tumore) 2. Lymphosarkom aus einer L.-Herde 3. Lymphozytose aus einer L.-Herde 4. Nachkommen von leukosekranken Rin- dern 5. normale Kälber aufgezogen mit Milch von Leukosetieren 6. normale Kälber aus gesunden Beständen normale Lymphknoten- zellen, HeLa-Zellen, Zellen vom chinesi- schen Hamster	Empfänglichkeit der Kul- turen f. VSV (Vesicular Stomatitis Virus) Gewebe der Gruppen 1 - 5 waren resistent gegen VSV, nicht dagegen Zel- len der Gruppe 6. In Ge- webekulturen aus Leukose- Material zeigten sich Zellanomalien, wie Rie- senzellen mit viellappi- gen und zersplitterten Kernen. Nach Behandlung dieser Kulturen mit dem Überstand aus resistenten Kulturen: cytopathische Effekte

Autor	Methode und Zellart	beobachtete Reaktion
Lange, W. (1965)	Einschichtzellkultur (Dulbeco u. Vogt) embryon. Rindernieren (REN) embryon. Rinderlungen (REL) Hühnerembryofibroblasten (HFK) Permanentzellstamm HeLa FL Lymphknotenkulturen gesunder und leukose- kranker Rinder	cythopathische Effekte auf FL-, HeLa-u. REN- Kulturen In FL- und HeLa-Kulturen vielkernige Riesenzellen mit zellfreiem Hof. Zyto- plasmatische Einschlüsse mit unklarer Bedeutung.- Aus Leukosematerial konn- ten d. Agenzien IL und L2 isoliert werden. Sie ergaben cythopathogene Effekte auf FL-, HeLa- und REN-Kulturen.
Liebermann, H., D. Urbaneck u. W. Wittmann (1965)	Einschichtzellkultur Primär- u. Subkultur Zellen leukosekranker, leukoseverdächtiger und leukoseunverdäch- tiger Rinder aus Lymphknoten - Milz Niere - Lunge Schilddrüse - Thymus	Es wurden keine Unter- schiede zwischen den einzelnen Kulturen ge- funden.
Ulbrich, F. (1966)	Einschichtzellkultur weiße Blutzellen gesunder und leukose- kranker Rinder	Phythämagglutinin M (Difco) stimuliert die Entwick- lung blastoider Zellen in Zellkulturen gesunder Rinder. In Kulturen aus leukosekranken Rindern ist kein oder ein nur ge- ringerer stimulierender Effekt zu beobachten.
Weinhold, E. (1966)	Einschichtzellkultur weiße Blutzellen gesunder und leukose- kranker Rinder	unter 1000 monozyten- ähnlichen Kulturzellen von gesunden Rindern wa- ren 3 - 37, von leukose- kranken Rindern 44 - 147 Zellen, die Lymphozyten phagozytierten.

Die beschriebenen Veränderungen an den Zellen weisen auf die Einwirkung eines infektiösen Agens hin. Es fehlen aber bisher schlüssige Beweise, daß es sich hier um Reaktionen auf den bzw. im Zusammenhange mit dem vermuteten Erreger der Rinderleukose handelt. Zur Klärung sind Übertragungsversuche mit Kulturmateriel an Rindern notwendig, deren Ergebnisse abgewartet werden müssen. Dasselbe gilt für die bisher durchgeführten und laufenden Übertragungsversuche an Hühnereiern und Mäusen (BINDRICH u. GENSEL, 7; HARTWIGK u. LANGE, 20; LANGE, 26; SALAMANN et al., 39; TOLLE et al., 47; WITTMANN u. URBANECK, 62). Eine Isolierung, Züchtung und Rückübertragung des vermuteten Erregers der Rinderleukose ist bisher nicht gelungen.

b) Chromosomenanomalien in Tumorzellen sind seit längerer Zeit bekannt. Anfang 1959 bemerkten BAIKIE und Mitarb. (3) als erste bei vier von fünf Menschen mit chronischer myeloischer Leukämie das Vorkommen eines besonders kleinen Exemplars in der Gruppe der kleinen akrozentrischen Chromosomen. Später wurden weitere Fälle beschrieben und das kleine Chromosom, das auch als "minute" (NOWELL u. HUNGERFORD, 34) bzw. Ph¹-Chromosom (Philadelphia-Chromosom) (BAIKIE et al., 2) bezeichnet wird, in Zusammenhang mit der Leukose des Menschen gebracht. Das gab auch Veranlassung, Chromosomenanalysen an Kulturen weißer Blutzellen von gesunden und leukosekranken Rindern durchzuführen. Nach einem 1. Bericht von ULBRICH und WIEGAND (54) konnten bei typischen Fällen von Rinderleukose keine Chromosomenanomalien gefunden werden.

Im Jahre 1964 erschienen Veröffentlichungen von HARE, MC FEELY, ABT und FEIERMAN aus Philadelphia (18) und von GUSTAVSON und ROCKBORN (17) aus Stockholm, in denen von Chromosomenveränderungen unterschiedlicher Art berichtet wurde.

ROCKBORN und GUSTAVSON hatten 3 Leukoserinder untersucht und eine Translokation festgestellt, so daß es so erschien, als hätte das betreffende Rind nur insgesamt 59, davon aber 3 metazentrische Chromosomen.

HARE und Mitarbeiter untersuchten 9 Leukoserinder und fanden bei 8 Tieren eine Aneuploidie, die aber nicht regelmäßig war. In 4 Fällen fehlte ein Geschlechtschromosom. Da diese Befunde insbesondere an Zellen aus tumorösen Lymphknoten erhoben wurden, dehnte ULBRICH (51) seine Untersuchungen aus und setzte sowohl von 14 leukosekranken (davon 6 tumoröse Form) als auch 14 gesunden Rindern Kulturen weißer Blutzellen aus dem strömenden Blut und von Lymphknotenzellen an. Weder die Ergebnisse von HARE und Mitarbeitern noch die von GUSTAVSON und ROCKBORN konnten bestätigt werden. Die Chromosomen leukosekranker Rinder unterschieden sich weder in Zahl noch Form von den Chromosomen gesunder Rinder.

c) Bei Untersuchungen auf weitere Eigenschaftsveränderungen weißer Blutzellen von leukosekranken Rindern fand ULBRICH (52), daß Phythämagglutinin M (Difco) auf die Lymphozyten gesunder Rinder einen für die Entwicklung der blastoiden Zellen stark stimulierenden Effekt hatte. Dagegen entwickelten sich aus den Lymphozyten von leukosekranken Rindern auch unter Phythämagglutininwirkung keine oder nur wenige blastoide Zellen. Diese Phythämagglutininwirkung bietet vielleicht eine Möglichkeit, weiße Blutzellen von gesunden und leukosekranken Rindern zu unterscheiden und damit die Rinderleukose zu diagnostizieren.

5. Vielfach waren auch die Bemühungen, die Rinderleukose mit serologischen Reaktionen zu diagnostizieren.

a) So wurden von einigen Untersuchern elektrophoretische Methoden eingesetzt, um die Serumeiweißverhältnisse bei leukosekranken

und gesunden Rindern gegenüberstellen zu können. Die Elektrophogramme von Leukoserindern, deren Seren mit der Agargel-elektrophorese untersucht worden waren, wiesen untereinander kein einheitliches oder durch den Leukosegrad bedingtes Merkmal auf. Die gegenüber Normaltieren auftretenden Veränderungen zeigten sich besonders beim f_2 - und f_3 -Globulin. Verschiedene klinisch und pathologisch-histologisch als Leukosetiere anzusprechende Rinder zeigten aber auch das Elektrophoresebild gesunder Tiere. Eine Korrelation zwischen dem f -Globulingehalt und den Leukozytenwerten konnte nicht gefunden werden. Weder die elektrophoretische Serumauftrennung noch der f -Globulingehalt gestatteten eine für die Leukose spezifische Auslegung der Ergebnisse (MATHAEUS und STRAUB, 29). Andere Autoren (ABERG, 1; GREVE, 16; HARTUNG, 19) kommen mit elektrophoretischen Methoden zu dem Ergebnis, daß Unterschiede zwar vorhanden sind, die aber nicht als für Leukose signifikant angesprochen werden können. WEINHOLD (53) fand bei elektrophoretischen Untersuchungen an Blutserum, Leukozyten- und Lymphknotenextrakten Veränderungen der qualitativen Zusammensetzung des Eiweißspektrums im Bereich der α - und β -Globuline bei Material von Leukoserindern, dagegen nicht von gesunden Rindern.

b) WIESNER (60) untersuchte die Möglichkeit einer Diagnose der Rinderleukose mit Hilfe der Abderhalden'schen Abwehrfermentreaktion. Er führte an 300 Rindern etwa 3000 Einzeluntersuchungen aus, deren Ergebnisse ihm die Abderhalden'sche Abwehrfermentreaktion als brauchbar für die Diagnostik der Rinderleukose erscheinen ließ. Er weist aber auch darauf hin, daß diese Methode durch die lange Versuchsdauer sehr arbeitsaufwendig sei und daß es zu Fehldiagnosen kommen kann, da die Abwehrfermente nicht immer und gleichmäßig ausgeschieden werden.

MEINECKE (32) fand dagegen keinen wesentlichen Unterschied in den Ergebnissen zwischen leukosekranken und gesunden Rindern.

c) Weitere serologische Reaktionen, deren Einsatz für die Diagnostik der Rinderleukose untersucht wurde, sind die Komplementbindungsreaktion (HUG, 23) und die Präzipitationsreaktion (SCHWERDT, 40). HUG konnte mit der von ihm gewählten Methode der KBR und mit den von ihm hergestellten Organextrakten als Antigen keine für die Leukose spezifischen Ambozeptoren nachweisen. Die Art der Antigengewinnung, die der Antigenherstellung für den Latextest nach Lehnert ähnlich ist, läßt vermuten, daß antigene Substanzen bei der Herstellung denaturiert sein könnten.

SCHWERDT (1963) benutzt für die Präzipitationsreaktion dieselbe Methode der Antigenherstellung wie HUG. Er kommt zu dem Schluß, daß die Präzipitationsreaktion zur Diagnose der Rinderleukose in der durchgeführten Form nicht geeignet ist.

d) Durch die indirekte Darstellung einer Antigen-Antikörperreaktion mit Hilfe der Fluoreszenzserologie versuchte TOLLE (45), eine Möglichkeit der Diagnose der Rinderleukose zu finden. In Abklatschpräparaten von Mäusetumoren (die Mäuse waren mit Leukosematerial infiziert worden), in Blutausstrichen von Rindern, die an tumoröser bzw. nur an hämatologisch nachweisbarer Leukose erkrankt waren, und von solchen Tieren, die noch keine hämatologischen Veränderungen zeigten, fand TOLLE fluoreszierende Partikel, von denen er annimmt, daß sie leukosespezifische Antigenpartikel darstellen. DUTCHER und Mitarbeiter (11) zeigten in ihren Versuchen, daß ein mit Fluorescein versetztes Globulin, das von einem Kalb mit Lymphosarkom gewonnen wurde, mit Gewebekulturen aus Leukosetieren fluoreszierte, nicht dagegen mit Lymphknotenmaterial aus "normalen" Tieren. Diese Untersuchungsergebnisse konnten von anderer Seite bisher nicht

bestätigt werden (WEINHOLD u. ULBRICH, 57).

e) LEHNERT (28) versuchte mit Hilfe des Latextestes leukose-spezifische Antikörper im Serum leukosekranker Rinder nachzuweisen. Er verwendete damit eine Methode, die sich bei der Diagnostik bakterieller Erkrankungen bereits bewährt hat (WIEDERMANN, 58). Das notwendige Antigen stellte LEHNERT aus veränderten Lymphknoten leukosekranker Rinder her und sensibilisierte damit Kunststoffpartikel (eine Polymetacrylplastikpartikel-Suspension). Nach LEHNERT kommt es bei der Einwirkung eines spezifische Antikörper gegen das Leukoseagens enthaltenden Serums auf die sensibilisierten Partikel zur Agglutination der Latexteilchen. Die Ergebnisse, die LEHNERT mit dieser Methode erzielte, gaben Anlass, dieses serodiagnostische Verfahren weiter auf seine Einsatzmöglichkeit für die Diagnostik der Rinderleukose zu überprüfen. HEESCHEN (21) modifizierte die von LEHNERT angegebene Methode und folgerte aus seinen Untersuchungsergebnissen, daß der Test, "sofern seine günstigen Ergebnisse erhärtet werden, die künftige Entwicklung der Leukosedagnostik und Leukosebekämpfung beeinflussen könnte".

C. Eigene Versuche

1. Zur Klärung der Frage, ob der von LEHNERT entwickelte Test für die Diagnose der Rinderleukose geeignet ist, wurden insgesamt 886 Serumproben von Rindern aus Hessen und 100 Serumproben von Rindern aus Bayern untersucht.

a) Material

Die Rinderseren aus Hessen wurden in Beständen der Gebiete Marburg - Kassel, Giessen - Alsfeld und Frankfurt/Main entnommen. Die Rinderbestände waren nach den Richtlinien des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten vom 8. 2. 1965 (8) untersucht und von den zuständigen Kreistierärzten und Veterinäruntersuchungsämtern als Leukosebestände bzw. als leukoseunverdächtige Bestände nachgewiesen worden. Insgesamt wurden in Hessen von Rindern aus 41 Beständen, davon 29 Leukosebeständen, Blutproben entnommen:

	Anzahl der Bestände	Zahl der Tiere	Sb. Tiere	Tiere anderer Rassen
Leukosebestände	29	683	457	226
leukoseunverdächtige Bestände	12	203	159	44
Gesamtzahl	41	886	616	270

100 Rinderseren aus Bayern stammten aus Rinderbeständen mit normalen Lymphozytenwerten. In dem Herkunftsgebiet wurde Rinderleukose bisher nicht festgestellt.

Die benötigten Lymphknoten wurden Schlachttieren auf den Schlachthöfen in Marburg, Gießen, Kassel und Frankfurt/Main

sowie Tieren, die im Veterinär-Pathologischen Institut der Justus Liebig-Universität Giessen zur Sektion kamen, entnommen. Organe und Lymphknoten der Tiere, von denen Lymphknoten zur Antigenherstellung verwendet werden sollten, wurden zur Sicherung der Diagnose "Leukose" im Veterinär-Pathologischen Institut histologisch untersucht. Die mittelmäßig vergrößerten Lymphknoten, die nur wenige Blutungs- und Nekroseherde aufwiesen, wurden von den noch schlachtwarmen Tieren in Plastikbeuteln gesammelt und bei -20° C eingefroren. Vor dem Einfrieren wurden sie aus ihrer Kapsel gelöst und damit das für die Weiterverarbeitung hinderliche Fett beseitigt.

Zur Herstellung eines negativen Lymphknotenextraktes wurden Lymphknoten von Tieren aus "leukosefreien" Beständen verwendet. Auch von diesen Tieren wurden Organe und Lymphknoten zur Kontrolle histologisch untersucht.

Zur Adsorption des "Antigens" stand Bacto-Latex-0,8l Suspension von Difco zur Verfügung.

b) Methode

Herstellung des Antigens:

Die tiefgefrorenen Lymphknoten von 8 - 10 Leukosetieren wurden im Kühlschrank so weit aufgetaut, daß sie mit dem Skalpell grob zerkleinert werden konnten. Das Lymphknotenmaterial wurde anschließend mit Aqua dest. im Verhältnis 2:1 versetzt und mit dem Ultraturax 5 Minuten zerkleinert. Der Gewebebrei wurde dann bei ca. 16 000 g zentrifugiert. Die überstehende rötliche Flüssigkeit wurde dekantiert und verworfen. Der zurückbleibende feste Gewebebrei wurde mehrfach, wenigstens viermal, mit einem starken Überschuß von Äther (pro narcosi) durch leichtes Schütteln entfettet. Zwischen den einzelnen Ätherextraktionen wurde der Gewebebrei in der Stockzentrifuge bei 3 000 U/Min. etwa 10 - 15 Minuten zentrifugiert. Der Äther

war nach dem letzten Extraktionsvorgang nur noch ganz schwach gelblich. Der zähe Gewebebrei wurde nun in großen Petrischalen in dünner Schicht ausgebreitet und in einer Tiefkühltruhe eingefroren und anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Das getrocknete Gewebe wurde zweimal mit Äther behandelt und kurz zentrifugiert, nachdem es zuvor im Mörser pulverisiert worden war. Nach diesen Ätherextraktionen wurde das Gewebe wieder auf Petrischalen flach ausgebreitet und bei Zimmertemperatur getrocknet und dann im Mörser fein zerrieben. Das so hergestellte Gewebepulver hatte eine schwach grau-weiße bis gelbliche Farbe und eine pulverige, faserige Struktur. Es läßt sich nach HEESCHEN (21) monatelang im Kühlschrank aufbewahren.

Für die Herstellung der "Antigensuspension" wurde 1 g des Lymphknotenpulvers mit 50 ml einer 8 %igen Saccharoselösung versetzt. Die Saccharoselösung wurde aus Aqua bidest. und Saccharose (reinst) hergestellt. Das Lymphknotenpulver-Saccharoselösung-Gemisch wurde dann eine Stunde kräftig geschüttelt und anschließend eine Stunde lang bei 37° C im Wasserbad gehalten. Ein ca. 15-stündiger Kühlschrankaufenthalt beschloß den Extraktionsvorgang. Die Suspension wurde nun in kleinere Mengen, die für den Gebrauch bestimmt waren, abgefüllt und eingefroren.

Vor dem Gebrauch wurde die benötigte Menge im Kühlschrank aufgetaut und dann bei 16 000 g eine Stunde zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde dekantiert und erneut eingefroren. Nach dem neuerlichen Auftauen war der Saccharoseextrakt häufig sehr trübe. Die Trübung rührt von einer Kältepräzipitation her (HEESCHEN, 21). Der Extrakt wurde dann nochmals bei 16 000 g zwei Stunden zentrifugiert. Der so erhaltene Extrakt war glasklar. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde jeder nach der beschriebenen Herstellungsart gewonnene

Extrakt auf einen konstanten Eiweißgehalt eingestellt. Diese Einstellung erfolgte mit dem Eppendorf-Photometer (Filter 546, Schichtdicke 1 cm) mit dem Biuretreagenz von Weichselbaum. Die Eiweißkonzentration soll nach HEESCHEN (22) etwa 30 mg/10 ml betragen.

Die so gewonnenen Extrakte wurden anschließend mit der Kunststoffpartikelsuspension in einem bestimmten Verhältnis vorsichtig gemischt, um Schaumbildung zu vermeiden. Für die Röhrchenagglutination wurden 0,1 ml Bacto-Latex-Suspension mit 10 ml Saccharoseextrakt gemischt.

Vorbereitung der Seren:

Für die Untersuchungen wurden nur nichthämolytische Seren verwendet. Das vom Blutkuchen durch Zentrifugation getrennte Serum wurde in kleine Portionen abgefüllt und bei -30° C aufbewahrt. Auf diese Weise konserviert, soll das Serum nach HEESCHEN (21) wochenlang seine Wirksamkeit behalten. Das zur Verwendung bestimmte Serum wurde mit einer 8 %igen Saccharoselösung im Verhältnis 1:2 verdünnt und anschließend für 20 - 25 Minuten im Wasserbad bei 56° C inaktiviert. Diese Inaktivierung ist nach den Beschreibungen (HEESCHEN, 21; WIEDERMANN, 58, 59) notwendig, um Spontanagglutinationen auszuschalten, die durch unspezifische und thermolabile Stoffe im Serum ausgelöst werden können. Die geringe Ausgangsverdünnung der Seren wurde gewählt, weil der Gehalt an agglutinierenden Substanzen im Serum leukosekranker Rinder verhältnismäßig gering und daher in Verdünnungen von 1:6 - 1:8 häufig nicht mehr nachweisbar ist.

Durchführung der Röhrchenagglutination:

0,5 ml inaktivierter Serumverdünnung wurden 0,5 ml des mit den Kunststoffpartikeln versetzten Extraktes hinzugefügt und durch 1 - 2 Minuten langes sanftes Schütteln, wobei Schaumbildung vermieden wurde, vermenget. Dieses Gemisch blieb 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen und wurde anschließend 3 Minuten

bei etwa 1 200 g zentrifugiert. In der Kuppe der meisten Zentrifugenröhrchen bildete sich durch das Zentrifugieren ein Bodensatz, der durch leichte kreisende Bewegungen aufgeschüttelt werden konnte. Im positiven Ausfall der Reaktion befanden sich deutliche Agglutinate in der Flüssigkeit.

Die Wirksamkeit der hergestellten Extrakte wurde durch Vergleichsuntersuchungen mit lyophilisierten Extrakten und positiven bzw. negativen Seren, die vom Bundesgesundheitsamt zur Verfügung gestellt worden waren, kontrolliert. Die selbst hergestellten Extrakte und die lyophilisierten Extrakte vom Bundesgesundheitsamt reagierten gleichartig. Die von HEESCHEN beschriebenen Agglutinationsabstufungen ((+), +, ++, +++, +++, -) konnten nicht unterschieden werden. Es war lediglich eine Differenzierung der Agglutinationen in -, +/- und + möglich. Mit + (positiv) wurde die Reaktion bezeichnet, bei der nach dem Aufschütteln des durch die Zentrifugation erhaltenen Niederschlages deutliche körnige Agglutinate zu erkennen waren. Im negativen (-) Fall war die Flüssigkeit nach dem Aufschütteln des Niederschlages wieder homogen getrübt. In zweifelhaften Fällen (+/-) ließ sich der Bodensatz schlechter als im negativen Fall aufschütteln, und es traten nur ganz vereinzelte, feine Agglutinate auf.

Ausser Extrakten von Lymphknoten leukosekranker Rinder wurden auf die gleiche Weise Extrakte aus Lymphknoten gesunder Tiere gewonnen und bei allen Untersuchungen vergleichend angewendet. Die Spendertiere stammten aus leukosefreien Beständen und hatten ein normales Blutbild. Auch pathologisch-histologisch erwiesen sich diese Rinder als leukoseunverdächtig.

c) Die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung und mit dem LEHNERT-Test sind in der Tabelle I dargestellt.

Bei Verwendung von Extrakten von Lymphknoten leukosekranker Rinder als Antigen wurde von 29 Leukosebeständen mit dem Lehnert-Test in 3 Beständen (10,3 %) keine Reaktion festgestellt. Dagegen zeigten Tiere aus 3 leukosefreien Beständen (23, %) eine positive Reaktion.

146 Tiere aus den 29 Leukosebeständen, die "stark erhöhte" Lymphozytenwerte aufwiesen, reagierten im Lehnert-Test wie folgt:

positiv	77 Tiere	(52,7 %)
negativ	66 Tiere	(45,0 %)
fraglich	3 Tiere	(2,3 %)

497 Tiere mit einem "normalen" Blutbild wurden auf Grund der Reaktionen im Latex-Test als

positiv	187 Tiere	(37,6 %)
negativ	298 Tiere	(60,0 %)
fraglich	12 Tiere	(2,4 %)

erfaßt.

Die 40 hämatologisch "fraglich" zu beurteilenden Tiere (mäßig erhöhte Lymphozytenwerte) reagierten bei der Untersuchung negativ. Unter den 303 Tieren aus leukoseunverdächtigen Beständen (alle Rinder hatten normale Lymphozytenwerte, keine tumoröse Erkrankungen) wurden 17 Tiere (5,6 %) mit einer positiven Reaktion im Lehnert-Test gefunden.

Auch mit dem Extrakt aus gesunden Lymphknoten wies der Lehnert-Test bei Tieren aus 20 Leukosebeständen (69,0 %) und aus 4 leukoseunverdächtigen Beständen (30,7 %) positive Reaktionen auf.

Von 146 Tieren mit stark erhöhten Lymphozytenwerten waren

positiv	63 Tiere	(43,2 %)
negativ	83 Tiere	(56,8 %)

und von 497 leukoseunverdächtigen Tieren

positiv 154 Tiere (31,0 %)

negativ 323 Tiere (65,0 %)

fraglich 20 Tiere (4,0 %)

Von 40 Tieren mit mäßig erhöhten Lymphozytenwerten zeigte nur 1 Tier (2,0 %) einen positiven Ausfall der Reaktion.

Die 303 Rinder aus leukoseunverdächtigen Beständen können durch das Ergebnis in eine

positive Gruppe mit 14 Tieren (4,6 %) und eine

negative Gruppe mit 289 Tieren (95,4 %)

eingeteilt werden.

Eine Gegenüberstellung der Befunde mit dem Lehnert-Test bei Rindern von leukoseunverdächtigen Beständen aus Hessen (Gebiet mit beträchtlichen Leukosevorkommen bei Rindern) und aus Bayern (Rinderleukose kommt kaum vor) zeigt Tabelle II.

2. Weitere Aufgabe war es, das für die Serumreaktion nach Lehnert benötigte "Antigen" zu reinigen.

a) Hierzu wurden, wie im folgenden beschrieben, die einzelnen Fraktionen, die bei der Herstellung des "Antigens" anfallen und darüberhinaus noch weitere Auftrennungsphasen des Extraktes auf ihre "Antigen"-Wirksamkeit getestet.

Die dazu verwendeten Extrakte, E_1 - E_5 , wurden aus leukotischen Lymphknoten von jeweils 5 Tieren gewonnen. Als Kontrolle dienten ein aus gesunden Lymphknoten von 4 Tieren gewonnener (E_G) und ein vom Bundesgesundheitsamt Berlin nach HEESCHEN präparierter, fertiger leukotischer Lymphknotenextrakt (E_{BGA}). Die verwendeten Testseren reagierten mit letzterem eindeutig negativ bzw. positiv. Es wurden die im folgenden beschriebenen Phasen der Extraktpräparation untersucht: (Die Ziffern stimmen mit denen der Fraktionen der Tabelle III überein.)

1. Der nach Zentrifugation entstandene flüssige Überstand der homogenisierten Lymphknoten wurde gegen dest. Wasser dialysiert und Saccharose zu einem 8 %igen Endgehalt hinzugefügt. Mit dem so vorbereiteten Überstand wurden Latexpartikel sensibilisiert und der Test mit negativem und positivem Serum durchgeführt.
2. Die nach der ersten Ätherextraktion des Gewebes durch Verdampfen des Äthers in einer Waschflasche mit 8 %iger Saccharoselösung sich hierin absetzenden Substanzen wurden auf ihre "Antigen"-Wirksamkeit getestet.
3. Der Ätherüberstand des trockenen Gewebeextraktes wurde wie der vorige behandelt und untersucht.
4. Als nächstes wurden die weiter nach Arbeitsvorschrift hergestellten endgültigen Extrakte getestet.
5. Zusätzlich wurde auch aus dem bei der Extrakterstellung zurückbleibenden Gewebebrei nochmals ein Extrakt hergestellt und auch dieser geprüft.

Über das bisherige Präparationsschema der HEESCHEN-Arbeit (PENDL u. FELIX, 35) hinaus wurden mit den dort erhaltenen endgültigen Extrakten bei 4° C Ammoniumsulfatfällungen, (pH 7,0), von 0 - 35 %, 35 - 50 % und 50 - 70 % durchgeführt.

6. Nach Zugabe des Ammoniumsulfates auf 35 %igen Endgehalt blieb das Präparat noch 2 Stunden im Kühlraum aufbewahrt und wurde dann in einer Christ-Zentrifuge bei 4 000 U/Min. zentrifugiert. Der Niederschlag wurde dialysiert und in 8 %iger Saccharoselösung gelöst, der Eiweißgehalt auf 0,3 % eingestellt und die Lösung auf ihren "Antigen"-Gehalt geprüft.
7. Der zum vorigen Test nicht benötigte Überstand wurde auf einen 50 %igen Ammoniumsulfatgehalt gebracht und wie zuvor weiter verarbeitet und geprüft.

8. Der zum vorigen Test nicht benötigte Überstand wurde dann auf 70 %igen Ammoniumsulfatgehalt gebracht und wie zuvor behandelt und getestet.

9. Der Rückstand wurde dann nochmals verarbeitet und geprüft.

b) Die Ergebnisse sind in der Tabelle III zusammengefasst.

Zusätzlich sollte versucht werden, ein elektrophoretisches Bild der Extraktkomponenten zu erhalten. Eingesetzt wurde der nach HEESCHEN fertig präparierte "Antigen"-haltige Extrakt. Die Elektrophorese wurde in 1 %igem Agargel (Ionagar No 2, Oxoid) in Na-Veronal-Puffer, pH 8,6, $I = 0,025$, bei 250 V über 4 Stunden durchgeführt. Der Puffer in den Elektrodengefäßen hatte die Ionenstärke $I = 0,1$. Zum Vergleich wurde normales Rinder-serum parallel im gleichen Agar getrennt. Die Pherogramme wurden mit Amidoschwarz 10B (Bayer) angefärbt.

Die Abbildung zeigt, daß der Hauptanteil des Lymphknotenextraktes anodisch wandert und zwar mit der Geschwindigkeit der α_2 -, α_3 - und β -Serum-Globuline. Im Bereich der α_2 - und α_3 -Globuline war eine genaue Auftrennung nicht zu erreichen. Eine kleinere, deutlich abgesetzte Fraktion war im α_1 -Globulin- und Albumin-Bereich zu erkennen. Der geringe Anteil kathodisch wandernden Extraktes liegt in Bezug auf seine Mobilität im Bereich des γ_1 -Globulins. Ein beträchtlicher Teil des Lymphknotenextraktes ist während der Elektrophorese am Start liegen geblieben.

D. Besprechung der Ergebnisse

In der Besprechung des Schrifttums über die Möglichkeiten der Leukosediagnose beim Rind wurde dargelegt, daß bisher für die Diagnose der Rinderleukose neben der Feststellung der tumorösen Veränderungen und dem pathologisch-anatomischen und histologischen Bild nur noch die Feststellung von Blutveränderungen praktischen Wert erreicht hat, daß aber auch diese Möglichkeiten nur begrenzt sind. Deshalb erregte die von LEHNERT im Jahre 1963 empfohlene serodiagnostische Methode großes Interesse und forderte zur Eignungsprüfung heraus.

Mit dem LEHNERT-Test untersuchte ich insgesamt 986 Rinder-
seren aus hessischen und bayerischen Rinderbeständen. Unter
den hessischen Rinderbeständen waren auf Grund der nach den
Richtlinien des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirt-
schaft und Forsten vom 8. 2. 1965 durchgeführten Untersuchun-
gen 29 Leukosebestände und 12 leukoseunverdächtige Bestände.

Nach den hämatologischen Reihenuntersuchungen der Herdbuch-
rinderbestände durch die Veterinäruntersuchungsämter Frank-
furt/Main, Giessen und Kassel ist Hessen recht erheblich mit
Rinderleukose verseucht. Nach LÜTHGEN (30) sind in Südhessen
3,78 %, in Kurhessen 4,0 % und in Oberhessen 3,7 % Rinderbe-
triebe leukoseverseucht. Die vorläufige Auswertung der vom
Veterinäruntersuchungsamt Giessen (KUWILSKY, 25) in der Zeit
vom 1. 10. 1964 bis Mitte September 1966 durchgeführten Rinder-
blutuntersuchungen auf Leukose (es wurden insgesamt 36 096
Rinder aus 3 959 Beständen untersucht) ergab:

Alle Tiere im Bestand mit

normalen Lymphozytenwerten:	2896 Bestände = 73 % (leukoseunver- dächtig)
mäßig erhöhte	" : 743 Bestände = 19 % (leukosever- dächtig?)
stark erhöhte	" : 320 Bestände = 8 % (leukosever- seucht?)

Wenn man die Blutuntersuchung nach den Richtlinien des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten vom 8. 2. 1965 für die Feststellung der Leukoseverseuchung zu Grunde legen kann, dann ist insbesondere der Raum um Gießen stark mit Rinderleukose verseucht, und dann muß auch erwartet werden, daß in den zur Zeit als leukoseunverdächtig bewerteten Beständen leukosebetroffene Rinder stehen.

Es war deshalb von Interesse, leukoseunverdächtige Bestände aus Hessen und leukoseunverdächtige Bestände aus einer Gegend, in der Rinderleukose bisher nicht beobachtet wurde, vergleichend zu untersuchen. Da Bayern die in der Bundesrepublik niedrigste Leukoseverseuchung aufweist, wurden Bestände einer leukosefreien Gegend in Bayern ausgewählt.

In Tabelle II sind die Befunde bei den leukoseunverdächtigen Beständen aus Hessen und aus Bayern gegenübergestellt. Von den hessischen Tieren wurden im LEHNERT-Test 4,4 % sowohl mit dem "Antigen" aus Leukoselymphknoten als auch mit dem "Antigen" aus Lymphknoten gesunder Rinder als "leukosepositiv" angezeigt.

Von den bayerischen Tieren sind 8 bzw. 5 % "positiv". Die Ergebnisse stimmen bei beiden Tiergruppen auffallend überein. Danach muß bei Anwendung der Methode mit etwa 5 % Fehlergebnissen gerechnet werden. Offensichtlich handelt es sich hier um "unspezifische" Reaktionen.

Beim Vergleich der Ergebnisse bei Tieren aus leukoseverseuchten und leukoseunverdächtigen Beständen Hessens fällt zunächst ebenfalls die weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse des LEHNERT-Testes mit "Leukoseantigen" und mit "Normalantigen" auf (Tabelle I). Von 26 "Leukosebeständen" wurden 26 (89,7 %) bzw. 20 (69 %) als positiv und 3 (10,3 %) bzw. 9 (31,0 %) als negativ, von den 13 leukoseunverdächtigen Beständen wurden

3 (23,0 %) bzw. 4 (30,7 %) als positiv und 10 (77,0 %) bzw. 9 (69,3 %) als negativ angezeigt. Werden statt der Bestandsbefunde die Befunde bei den einzelnen Rindern verglichen, so ergeben sich folgende Relationen:

Von insgesamt 683 Rindern aus "Leukosebeständen" sind im LEHNERT-Test 264 (38,7 %) bzw. 218 (31,9 %) positiv, 15 (2,2 %) bzw. 20 (2,9 %) fraglich und 404 (59,1 %) bzw. 445 (65,2 %) negativ; von insgesamt 303 Rindern aus "leukoseunverdächtigen" Beständen sind 17 (5,6 %) bzw. 14 (4,6 %) positiv und 286 (94,4 %) bzw. 289 (95,4 %) negativ.

Weiterhin ist aus Tabelle I zu ersehen, daß in "Leukosebeständen" wesentlich mehr Rinder im LEHNERT-Test positiv reagieren als in "leukoseunverdächtigen" Beständen.

Eine Deutung der Befunde ist nur schwer möglich. Dazu liegen zu wenig aussagende Untersuchungen über die Eigenschaften des Antigens vor. Auch die eigenen Versuche, das nach den Rezepten von LEHNERT und HEESCHEN hergestellte "Antigen" zu reinigen, konnten zu dieser Frage einen nur geringen Beitrag leisten.

Die in der Tabelle III zusammengefassten Ergebnisse der Untersuchung einzelner Fraktionen zeigen eindeutig, daß in keiner Fraktionsstufe das "Antigen" durch diese Präparation angereichert vorhanden ist. Lediglich mit dem Extrakt der Präparationsstufe 4 (Endprodukt der Methode nach HEESCHEN) wurden übereinstimmend mit positivem Serum in allen zu erwartenden 5 Fällen (E_1 - E_5) auch positive Reaktionen erhalten. Jedoch sind auch hier mit negativem Serum zwei positive Reaktionen, also zwei Fehlbestimmungen zu verzeichnen.

Innerhalb der Extrakte (E_1 - E_5) über alle Fraktionsstufen hinweg sind theoretisch je nach Verteilung des "Antigens" auf die einzelnen Fraktionsstufen mit positivem Serum je 1 - 9 positive

Reaktionen und mit negativem Serum 9 negative Reaktionen zu erwarten. In Wirklichkeit traten aber neben einigen positiven Reaktionen, die mit positivem Serum erhalten wurden und die sich praktisch über alle Fraktionen verteilen, auch fast ebensoviel positive Reaktionen mit negativem Serum auf. Die mit den E_G -Fraktionen erhaltenen Ergebnisse sind meist nicht eindeutig oder es sind Fehlreaktionen. Auch der Kontroll-extrakt E_{BGA} lieferte nach Weiterverarbeitung über Punkt 4 des Schemas hinaus keine einwandfreien Ergebnisse. Insgesamt ergibt sich aus diesen Versuchen, daß es nicht gelungen ist, die Spezifität des Testes zu erhöhen.

Aus der Tatsache, daß bei dem Versuch der elektrophoretischen Auftrennung des Extraktes keine deutlichen einzelnen Fraktionen zu erkennen waren und ein beträchtlicher Teil des Extraktmaterials am Startpunkt liegenblieb, ist zu vermuten, daß die Proteine, wenigstens teilweise, beim Aufarbeiten des Materials denaturierten.

Zu dieser Vermutung besteht auch weiterhin Anlass, wenn einzelne Schritte der Präparation des Extraktes daraufhin analysiert werden. So wird beim Zerkleinern des Gewebes mit dem Star-Mix (etwa 5 Min. auf Höchsttouren) Wärme frei, die unbedingt abgeleitet werden muß. Nur allzu leicht kommt es auch zu einer Schaumbildung. Nachdem die Gewebsmasse zum letzten Male mit Äther behandelt worden war, wurde sie bei Zimmertemperatur für längere Zeit getrocknet. Der aber wohl entscheidendste Schritt, bei dem es zu Denaturierungen kommt, ist jedoch, daß das in 8 %iger Saccharoselösung aufgenommene Organpulver eine Stunde lang kräftig geschüttelt und für eine weitere Stunde in einem Wasserbad von 37°C belassen wird.

So wäre es angebracht, die Präparationsmethoden zu ändern, wenn

ein spezifischeres Ergebnis erzielt werden soll, um die Methode für die serologische Diagnose der Rinderleukose einsetzen zu können.

E. Zusammenfassung

Es galt, die Frage zu klären, ob der von LEHNERT entwickelte Test für die Diagnose der Rinderleukose geeignet ist. Dazu wurden aus Hessen 683 Tiere aus leukoseverdächtigen Beständen und 203 Tiere aus leukoseunverdächtigen Beständen, sowie 100 Tiere aus einem Gebiet Bayerns, in dem bisher keine Leukose festgestellt worden war, mit dem von HEESCHEN modifizierten LEHNERT-Test untersucht. Positive Ergebnisse wurden sowohl in "leukoseunverdächtigen" (auch in Beständen des leukosefreien Gebietes Bayern) als auch in "leukoseverdächtigen" Beständen gefunden. In letzteren war jedoch eine wesentlich höhere Anzahl an positiven Ergebnissen zu verzeichnen.

Es wurden daher Versuche angestellt, das "Antigen" zu reinigen. Es gelang aber nicht, die Spezifität des "Antigens" zu erhöhen. Bei dem anschließenden Versuch, das "Antigen" elektrophoretisch aufzutrennen, konnten keine deutlichen Einzelfraktionen erkannt werden. Ein beträchtlicher Teil des "Antigens" blieb am Startpunkt liegen. Daraus und aus der Art der Antigenpräparierung ist zu schließen, daß die Proteine beim Aufarbeiten des Materials denaturierten.

Die Versuche zeigen, daß der LEHNERT-Test für die praktische Diagnostik in der angewendeten Form nicht geeignet ist und daß versucht werden sollte, ein "Antigen" mit schonenderen Methoden herzustellen.

F. Literaturverzeichnis

1. Aberg, B.: Chemismus des Blutes bei den leukämischen Erkrankungen.
Mh. Vet.-Med. 12, 657 - 659 (1957)
2. Baikie, H. G., Brown, W.M.C., Buckton, K.E., Harnden, D. G., Jacobs, P.A. und J. Tough: A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia.
Nature (Lond.) 188, 1165 - 1166 (1960)
3. Baikie, H. G., Brown, W.M.C., Jacobs, P.A. und J. S. Milne: Chromosome studies in human leukaemia.
Lancet, 2, 425 - 428 (1959)
4. Bauer-Sic, P.: Zur Zytochemie der Leukozyten des Rindes. Normalbefunde und Beobachtungen bei einigen Leukosepatienten.
Zbl. Vet.-Med. Reihe A, 10, 365 - 380 (1963)
5. Bendixen, H. J.: Untersuchungen über die Rinderleukose in Dänemark.
II. Pathogenese und Enzoootologie der übertragbaren Rinderleukose.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 67, 57 - 63 (1960)
6. Bendixen, H. J.: Untersuchungen über die Rinderleukose in Dänemark.
IV. Das derzeit angewandte Bekämpfungsverfahren.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 67, 257 - 262 (1960)
7. Bindrich, H. u. Ch. Gensel: Ergebnisse virologischer Untersuchungen über die Rinderleukose.
Mh. Tierheilk. 15, 169 - 182 (1963)
8. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten: Richtlinien zur "Bekämpfung der Rinderleukose"
Rundschreiben des BELF vom 8. 2. 1965
(- II C 2 - 2855 - 106/64 -)
Vorschriften für die Veterinärverwaltung 13, 47 - 51 (1965)

9. Dobberstein, J. und E. Paarmann: Die sogenannte Lymphadenose des Rindes (Rinderleukose).
Z. Infekt.-Kr. Haustiere 46, 65 - 109 (1934)
10. Dutcher, R. M., Larkin, E. P. und R. R. Marshak: Virus-like particles in cow's milk from a herd with a high incidence of lymphosarcoma.
J. nat. Cancer Inst. 33, 1055 - 1059 (1964)
11. Dutcher, R. M., Szekeley, I. E., Bartie, B. W. und J. W. Switzer: Attempts to demonstrate a virus for bovine lymphosarcoma.
Zbl. Vet.-Med. Reihe B, 11, 93 - 109 (1964)
12. Fortner, J.: Die Leukose der Rinder.
Mh. Tierheilk. 5, 184 - 188 (1953)
13. Gard, S. und G. Rockborn: Gewebekulturen bei Rinderleukose.
Int. Symp. über vergl. Leukoseforschung, Hannover, 12.u.13. Aug. 1963
14. Götze, R., Rosenberger, G. und G. Ziegenhagen: Die Leukose des Rindes: Ihre hämatologische und klinische Diagnose.
Mh. Vet.-Med. 2, 517 - 526 (1954)
15. Götze, R., Rosenberger, G. und G. Ziegenhagen: Über Ursachen und Bekämpfung der Rinderleukose.
V. Übertragungswege und Bekämpfungsvorschlag.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 63, 121 - 125 (1956)
16. Greve, D.: Mikroelektrophoretische Untersuchungen der Serumweißverhältnisse des Rindes bei Leukose, Brucellose und Tuberkulose.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 62, 536 - 540 (1955)

17. Gustavson, J. und G. Rockborn: Chromosome abnormality in three cases of lymphatic leukaemia in cattle. Nature (Lond.) 208, 990 (1964)
18. Hare, W. C. D., McFeely, R. A., Abt, D. A. und I. R. Feierman: Chromosomal studies in bovine lymphosarcoma J. nat. Cancer Inst. 33, 105 - 118 (1964)
19. Hartung, J.: Papierelektrophoretische Untersuchungen an Blutserum gesunder und kranker Rinder unter besonderer Berücksichtigung der Leukose. Dtsch. tierärztl. Wschr. 61, 300 - 301 (1954)
20. Hartwigk, H. und W. Lange: Ist die Rinderleukose auf kleine Versuchstiere (Kaninchen, Mäuse) übertragbar? Wien. tierärztl. Mschr. 51, 50 - 61 (1964)
21. Heeschen, W.: Versuche zur Anwendung eines modifizierten Latextestes in der serologischen Diagnose der Rinderleukose. Dtsch. tierärztl. Wschr. 71, 257 - 264 (1964)
22. Heeschen, W.: persönliche Mitteilung vom 4.9.1964
23. Hug, J. O.: Versuche über die Anwendungsmöglichkeit der Komplementbindungsreaktion bei der Rinderleukose. Inaug. Diss. Hannover 1957
24. Knocke, K. W.: Elektronenmikroskopische Befunde an Lymphozyten und Lymphoidzellen des peripherischen Blutes bei der Leukose des Rindes. Zbl. Vet.-Med., Reihe B, 11, 1 - 10 (1964)
25. Kuwilsky, S.: persönliche Mitteilung v. 3. 10. 1966

26. Lange, W.: Versuche zur Übertragung der Rinderleukose auf die Albinomaus.
Zbl. Vet.-Med. Reihe B, 11, 446 - 454 (1964)
27. Lange, W.: Gewebekulturen nach Inokulation mit zellfreien Rinderleukose-Extrakten.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 197, 299 - 306, (1965)
28. Lehnert, E.: Zur Frage der Existenz leukosespezifischer Antikörper im Blutserum leukotischer Rinder.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 77, 113 - 115 (1964)
29. Liebermann, H., Urbanek, D. und W. Wittmann: Untersuchungen zur Ätiologie der Rinderleukose.
2. Gewebekulturstudien
Arch. exp. Vet.-Med. 19, 1383 - 1404 (1965)
30. Lütthgen, W.: Untersuchungen über die Verbreitung der Leukose in den Rinderbeständen in Südhessen.
Vortrag geh. anl. 106. Frankfurter Referierabend am 22. 9. 1966
31. Mathaeus, W. und O. C. Straub: Serumelektrophoretische und hämatologische Befunde bei gesunden, an Leukose und MKS erkrankten Rindern.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 78, 421 - 425 (1965)
32. Meinecke, K.: Untersuchungen über die Brauchbarkeit der Abderhalden'schen Abwehrfermentreaktion für die Diagnose der Rinderleukose.
Inaug. Diss. Hannover 1958
33. Nobel, T. A. und F. Neumann: Bovine Leucosis in Israel with special reference to a histochemical method of diagnosis.
Bull. Off. int. Epiz. 62, 701 - 710 (1964)

34. Nowell, P. C. und D. A. Hungerford: Chromosome studies on normal and leukaemic human leukocytes.
J. nat. Cancer Inst. 25, 85 - 109 (1960)
35. Pendl, J. und K. Felix: Ammoniumsulfat: fraktionierte Aus-salzung.
Hoppe-Seyler/Thierfelder Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse Bd. 4, Teil II, 229 - 232
10. Auflage (1960)
36. Renk, W.: Pathologisch-anatomische und histo-logische Untersuchungen an Rindern mit anhaltenden lymphocytotischen Blutbefunden und an Rindern mit Leukose.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 78, 381 - 386 (1965)
37. Ritter, H.: Über die Verbreitung der Rinderleu-kose.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 69, 329 - 331 (1962)
38. Rosenberger, G.: Ergebnisse zwölfjähriger Leukose - Untersuchungen an der Rinderklinik Hannover.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 70, 410 - 417 (1963)
39. Salamann, M.H., Evans, R. und J. C. Greatorex: Leukaemia in mice inoculated with plasma or tissue extracts from a heifer suffering from bovine malignant lymphoma.
Int. Symp. über vergleichende Leu-koseforschung, Hannover, 12./13. Aug. 1963
40. Schwerdt, H.: Versuche über die Brauchbarkeit der Präzipitationsreaktion zur Diagnose der Rinderleukose.
Inaug. Diss. Hannover 1963

41. Sorensen, G. D.
und G.H.Theilen: Electron microscopic observations
of bovine lymphosarcoma.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 108, 1231 - 1240
(1963)
42. Stöber, M.: Zytomorphologische und zytochemische
Blutuntersuchungen beim Rind im Hin-
blick auf ihre Brauchbarkeit für
die Diagnostik der lymphatischen Leu-
kose.

Habilitationsschrift, Hannover 1965
43. Du Toit, P. J.: Beitrag zur Morphologie des normalen
und des leukämischen Rinderblutes.

Folia hämat. 21, 1 - 58 (1916 - 1917)
44. Du Toit, P. J.: Weitere Untersuchungen über die
Lymphozytomatose des Rindes.

Z. Infekt.-Kr. Haustiere 20, 320 -
350 (1919 - 1920)
45. Tolle, A.: Die fluoreszenzserologische Diagnose
der Rinderleukose.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 68, 193 -
202 (1961)
46. Tolle, A.: Zur Beurteilung quantitativer hämato-
logischer Befunde im Rahmen der Leu-
kose-Diagnostik beim Rind.

Zbl. Vet.-Med. Reihe B, 12, 281 - 290
(1965)
47. Tolle, A., Eger, W.
und C. Schreier: Übertragbare Nierenveränderungen bei
männlichen Mäusen des Stammes NMRI
nach Injektion von Rinderleukosema-
terial.

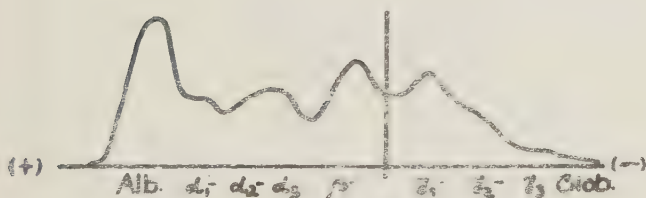
Dtsch. tierärztl. Wschr. 69, 609 -
612 und 680 - 685 (1962)
48. Tolle, A., Rojahn,
A. und G. Hasse: Reihenuntersuchungen auf Rinderleuko-
se in einem geschlossenen nieder-
sächsischen Gebiet.

Mh. Tierheilk.:
Rindertuberkulose, Brucellose und Leu-
kose, 12, 192 - 200 (1963)

49. Überschar, S.: Elektronenoptische Untersuchungen an den Zellen der tumorösen Form der Leukose des Rindes.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 70, 417 - 422 (1963)
50. Ulbrich, F.: Gastvorlesung an der Justus Liebig-Universität Giessen am 14. 12. 1962
51. Ulbrich, F.: Chromosomenanalyse bei Mensch und Tier.
Vortrag anl. 100. Frankfurter Referierabend am 19. 11. 1965
52. Ulbrich, F.: Gewebekultur von Lymphozyten gesunder und leukosekranker Rinder.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 79, 122 - 124 (1966)
53. Ulbrich, F. und D. Wiegand: 2. Symposium der Dtsch. Forschungsgemeinschaft über Fragen der Rinderleukoseforschung, Hannover 1962
54. Ulbrich, F. und D. Wiegand: Kultur weißer Blutzellen von gesunden und leukosekranken Rindern.
Proc. 17th World Vet. Congr. - Hannover, 1, 459 - 463 (1963)
55. Weinhold, E.: Zellphagozytose in der Rinderleukozytenkultur.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 79, 130 - 132 (1966)
56. Weinhold, E.: Zit. aus: E. Weinhold: Viren als ätiologischer Faktor bei Leukämien und Tumoren.
Bundesgesundheitsblatt 9, 246 - 247 (1966)
57. Weinhold, E. und F. Ulbrich: persönliche Mitteilung

58. Wiedermann, G.: Der Latextest in der Bakteriologie und Serologie.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 187, 278 - 283 (1962)
59. Wiedermann, G.: Zum Mechanismus des Latextestes mit bakteriellen Antigenen.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 184, 555 - 559 (1962)
60. Wiesner, E.: Die prämortale Diagnose der Leukose des Rindes mit Hilfe der Abderhaldenschen Abwehrfermentreaktion.
Mh. Vet.-Med. 10, 337 - 344 (1955)
61. Winquist, G.: Die Hämatologie der Tierleukosen.
Mh. Vet.-Med. 13, 161 - 164 (1958)
62. Wittmann, W. und D. Urbaneck: Untersuchungen zur Ätiologie der Rinderleukose
I. Übertragungsversuche auf Laboratoriumsmäuse.
Arch. exp. Vet.-Med. 19, 1369 - 1382 (1965)
63. Ziegenhagen, G. und H. Döhmen: Über den Wert der morphologischen Beurteilung der Leukozyten für die Diagnose der Rinderleukose.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 62, 532 - 534 (1955)

Elektrophoretische Trennung
 eines Extraktes aus leukotischen Lymphknoten (Abb. oben)
 und eines Rinderserums (Abb. unten)



Das Diagramm zeigt oben das mit dem Extinktionsschreiber
 aufgenommene Elektrochromogramm des Extraktes aus leukotisch
 veränderten Lymphknoten (Arbeitsbedingungen siehe Text)
 und darunter zum Vergleich das eines normalen Rinderserums.

Tabelle I

Ergebnis der Reaktion	Leukosebestände				Leukoseunverdächtige Bestände	
	29 Bestände davon	146 Rinder mit stark erhöhten Lymph.Wert. davon	497 Rinder mit norma- len Lympho- zytenwerten davon	40 Rinder mit mäßig erhöhten Lymph.Wert. davon	13 Bestände davon	303 Tiere davon
Lehnert-Test mit Extrakt aus Leukose- lymphknoten	26 (89,7 %) 3 (10,3 %) -	77 (52,7 %) 66 (45,0 %) 3 (2,3 %)	187 (37,6 %) 298 (60,0 %) 12 (2,4 %)	- 40 (100,0 %) -	3 (23,0 %) 10 (77,0 %) -	17 (5,6 %) 286 (94,4 %) -
Lehnert-Test mit Extrakt aus Lymph- knoten ge- sunder Tiere	20 (69,0 %) 9 (31,0 %) -	63 (43,2 %) 83 (56,8 %) -	154 (31,0 %) 323 (65,0 %) 20 (4,0 %)	1 (2,0 %) 39 (98,0 %) -	4 (30,7 %) 9 (69,3 %) -	14 (4,6 %) 289 (95,4 %) -

Tabelle II: Befunde bei Leukoseunverdächtigen Beständen

Lehnert-Test mit	Ergebnis der Reaktion	aus einer Leukose- gegend 203 Tiere davon	aus einer Leukosefreien Gegend 100 Tiere davon
Extrakt aus Leukoselymphknoten	positiv negativ fraglich	9 (4,4 %) 194 (95,6 %) -	8 (8 %) 92 (92 %) -
Extrakt aus Lymphknoten gesunder Tiere	positiv negativ fraglich	9 (4,4 %) 194 (95,6 %) -	5 (5 %) 95 (95 %) -

Tabelle III

Auf "Antigen"-Ge- halt untersuchte Fraktionen	E _I		E _{II}		E _{III}		E _{IV}		E _V		E _{BGA}		E _G	
	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
1) Gewebeerstand nach der 1. Zen- trifugation	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2) Ätherüberstand nach der 1. Ex- traktion	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
3) Äther aus der Extraktion des getrockneten Ge- webes	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
4) 1. Extrakt	++	-	+	-	+	+	++	-	+	+	+	+	(+)	(+)
5) 2. Extrakt	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	(+)	(+)
6) Extrakt aus 35% Ammoniumsulfat- fällung	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	(+)
7) Extrakt aus 35- 50 % Ammonium- sulfatfällung	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	(+)	+	-
8) Extrakt aus 35- 50 % Ammonium- sulfatfällung	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	(+)	+	-
9) Rückstand	-	(+)	-	+	(+)	-	+	-	-	-	-	-	-	+

Tabelle III gibt die Reaktionen der einzelnen untersuchten Fraktionen auf ihre "Antigen"-Wirksamkeit bei der Darstellung des "Antigen"-Extraktes mit positivem und negativem Serum wieder. E_I - E₅ = Extrakte aus leukotischen Lymphknoten von jeweils 5 Tieren; E_G = negativer Kontrollextrakt aus gesunden Lymphknoten von 4 Tieren; E_{BGA} = positiver Kontrollextrakt aus leukotischen Lymphknoten, vom BGA, als Fertigpräparat nach Heeschen, geliefert; ++ = starke Agglutination; + = gut erkennbare Agglutination; - = keine Agglutination; + = zweifelhafte Reaktion.

Für die Überlassung des Themas danke ich Herrn Professor Dr. F. Ulbrich sehr herzlich. Ebenso danke ich ihm für die Unterstützung, die er mir bei der Bearbeitung des Themas zukommen ließ, nicht zuletzt auch dafür, daß ich dieses Problem als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere bearbeiten durfte.

Dem leitenden Direktor und Professor im Bundesgesundheitsamt, Herrn Professor Dr. M. Zunker, danke ich für die freundliche Überlassung von Leukoseextrakten und leukosepositiven bzw. leukosenegativen Seren.

Herrn Oberregierungsveterinärerrat Dr. E. Kauker, Direktor des Veterinäruntersuchungsamtes in Kassel und Herrn Oberregierungsveterinärerrat Dr. S. Kuwilsky, Direktor des Veterinäruntersuchungsamtes in Giessen, danke ich für ihre Hinweise und Angaben über Leukose- und leukosefreie Bestände in den Einzugsgebieten ihrer Untersuchungsämter.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Regierungsveterinärdirektor Dr. G. Beck, Direktor der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung in Schleißheim, für die Bereitstellung von Rinderseren, die für meine Arbeit von besonderem Wert waren.

Auch Frau Dr. E. Balke und Herrn Dr. J. Schmitt danke ich für ihre Beratung und das stets gezeigte Interesse.

Lebenslauf

Am 19. September 1936 wurde ich, Wolfgang Buss, als Sohn des Tierarztes Dr. med. vet. Walter Buss und seiner Ehefrau Emmy, geborene Sommer, in Frankfurt/Oder geboren.

Vom Oktober 1942 bis Dezember 1944 besuchte ich die Volksschule in Frankfurt/Oder. Vom Mai 1945 bis August 1947 ging ich in die Volksschule in Giessen. Im Oktober 1947 wurde ich in das Alte Realgymnasium in Giessen umgeschult. Hier legte ich am 3. März 1958 die Reifeprüfung ab.

Das Studium der Veterinärmedizin begann ich im Sommersemester 1958 an der Justus Liebig-Universität in Giessen und beendete es hier mit der tierärztlichen Prüfung am 13. Februar 1963.

Meine Praktikantenzeit absolvierte ich bei Herrn Dr. H. Hartwich in Betzdorf/Sieg, bei dem ich anschließend als Assistent blieb. Mit Wirkung vom 1. September 1963 erhielt ich meine Approbation als Tierarzt. Seit dem 1. Juni 1964 bin ich am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere mit der Verwaltung einer Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten beauftragt.

FOTO-DRUCK

H. Gahmig · Graph. Anstalt · 63 Gießen · Klinikstraße 21 · Telefon 78546

FOTO-DRUCK

H. Gahmig · Graph. Anstalt · 63 Gleßen · Klinikstraße 21 · Telefon 78546